

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brézil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

5

10

ADENOVIRUS DEFECTIFS ET LIGNEES DE COMPLEMENTATION CORRESPONDANTES

15

L'invention a pour objet de nouveaux vecteurs adénoviraux défectifs permettant le transfert et l'expression de gènes d'intérêt dans une cellule ou un organisme eucaryote hôte ainsi que de nouvelles lignées de complémentation complétant *en trans* les fonctions virales essentielles qui ont été délétées du génome de ces adénovirus recombina

20

nts. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

Les adénovirus sont des virus à ADN qui présentent un large spectre d'hôte. Ils ont été mis en évidence dans de nombreuses espèces animales et de nombreux types cellulaires. Il existe plusieurs sérotypes qui diffèrent notamment au niveau de la séquence de leurs génomes. La plupart des adénovirus humains sont peu pathogènes et ne produisent généralement que des symptômes bénins.

25

L'adénovirus pénètre dans la cellule hôte permissive par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, puis il est internalisé et passe dans des endosomes. Leur acidification contribue à un changement de conformation du virus et à sa sortie dans le cytoplasme. Puis, l'ADN viral associé à certaines protéines virales nécessaires aux premières étapes du cycle répl

30

catif, pénètre dans le noyau des cellules infectées où sa transcription est assurée par des enzymes cellulaires. La réplication de l'ADN adénoviral a lieu dans le cytoplasme des cellules infectées. Les nouveaux virus prend également place dans le noyau. Dans un dernier stade, les protéines virales s'assemblent de manière à former des capsides vides de structure

icosaédrique, dans lesquelles l'ADN adénoviral est ensuite encapsidé. Les particules virales ou virions sont libérés des cellules infectées et sont susceptibles d'infecter d'autres cellules permissives.

5 Le cycle infectieux de l'adénovirus s'effectue en 2 étapes :

- la phase précoce qui précède l'initiation de la réplication du génome adénoviral et qui permet la production des protéines régulatrices intervenant au niveau de la réplication et de la transcription de l'ADN viral, et
- la phase tardive qui conduit à la synthèse des protéines structurales.

15 D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une molécule d'ADN linéaire, bicaténaire et d'environ 36kb de long qui contient les séquences codant pour plus de 30 protéines. A chacune de ses extrémités, est présente une courte séquence de 100 à 150 nucléotides selon les sérotypes, inversée et désignée ITR (Inverted Terminal Repeat). Les ITRs sont impliqués dans la réplication du génome adénoviral. La région d'encapsulation, d'environ 300 nucléotides, est située à l'extrémité 5' du génome juste après l'ITR 5'.

20 Les gènes précoces sont répartis en 4 régions qui sont dispersées dans le génome adénoviral, désignées E1 à E4 (E pour "Early" signifiant précoce en anglais). Les régions précoces comprennent au moins six unités transcriptionnelles qui possèdent leurs propres promoteurs. L'expression des gènes précoces est elle même régulée, certains gènes étant exprimés avant d'autres. Trois régions, respectivement E1, E2 et E4, sont essentielles à la

25 réplication virale. Ainsi, si un adénovirus est déficient pour l'une de ces fonctions, c'est à dire s'il ne peut pas produire au moins une protéine codée par l'une de ces régions, celle-ci devra lui être fournie *en trans*.

30 La région précoce E1 est située à l'extrémité 5' du génome adénoviral et contient 2 unités de transcription virales, respectivement E1A et E1B. Cette région code pour des protéines qui interviennent très précocement dans le cycle viral et sont essentielles à l'expression de presque tous les autres gènes de l'adénovirus. En particulier, l'unité de

35 transcription E1A code pour une protéine trans-activatrice de la transcription des autres gènes viraux, qui induit la transcription à partir des promoteurs des régions E1B, E2A, E2B et E4.

- Il ressort de ce qui précède que les adénovirus possèdent des caractéristiques intéressantes qui font d'eux des vecteurs de choix pour le transfert de gènes d'intérêt. De nombreux adénovirus recombinants sont décrits dans la littérature (Rosenfeld et al., 1991, Science, 252, 431-434 ; Rosenfeld et al., 1992, Cell, 68, 143-155). D'une manière générale, ils dérivent de l'Ad5 et sont défectifs pour la fonction E1, afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. En outre, la région E3 non-essentielle peut également être déléetée. Les séquences exogènes sont intégrées à la place de la région E1 ou E3.
- 5
- 10 Ainsi, ces adénovirus défectifs ne peuvent être propagés que dans une lignée cellulaire complétenant *en trans* la fonction E1 essentielle à la réplication virale. A l'heure actuelle, la seule lignée de complémentation utilisable est la lignée de rein embryonnaire 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72), qui résulte de l'intégration dans ses chromosomes, d'un fragment du génome de l'Ad5 comprenant notamment l'extrémité 5'
- 15 du génome viral ; de sorte que la lignée 293 complémente les adénovirus défectifs pour la fonction E1. Les cellules 293 contiennent des séquences qui se trouvent aussi dans l'adénovirus recombinant défectif, comme l'ITR 5', la région d'encapsidation et la partie en 3' de la région E1B comportant des séquences codant pour les protéines précoces .
- 20 La faisabilité du transfert de gènes en utilisant des adénovirus est maintenant établie. Mais, la question de leur innocuité reste posée. En effet, ils sont capables de transformer certaines lignées cellulaires en culture, ce qui reflète le pouvoir potentiellement oncogène de certains des produits d'expression du génome adénoviral, essentiellement de la région E1 et probablement E4, au moins pour certains sérotypes. De plus, la probabilité de
- 25 recombinaison génétique entre un adénovirus défectif de l'art antérieur, notamment un adénovirus recombinant, et soit un adénovirus naturel ou sauvage (issu d'une contamination accidentelle ou d'une infection opportuniste d'un organisme hôte), soit un fragment de génome adénoviral intégré dans la lignée de complémentation 293 n'est pas négligeable. En effet, il suffit d'un événement de recombinaison pour restaurer la fonction
- 30 E1 et générer un adénovirus recombinant non-défectif capable de se disséminer dans l'environnement. Il est aussi envisageable qu'un adénovirus naturel sauvage co-infectant la même cellule qu'un adénovirus défectif puisse complémente ce dernier pour la fonction E1 provoquant une co-dissémination des deux virus. Enfin, certains types de cellules eucaryotes produisent des protéines présentant une activité E1A-like également
- 35 susceptibles de complémente partiellement les adénovirus défectifs qui les infectent.

Il est donc souhaitable de disposer de vecteurs adénoviraux performants présentant le minimum de risque, en vue de leur utilisation en thérapie génique pour corriger *in vivo*

des défauts génétiques graves et traiter certaines maladies pour lesquelles on ne dispose pas d'approches thérapeutiques efficaces. C'est de leur obtention que dépend le succès de la thérapie génique appliquée à l'homme.

- 5 De plus, il existe des interrogations à propos de l'obtention de la lignée 293. Ces interrogations peuvent être de nature à compromettre l'acceptabilité des produits destinés à un usage humain qui en seront dérivés. Il serait utile de disposer de lignées de complémentation dont l'origine et l'histoire sont exactement connues pour produire des particules d'adénovirus recombinants destinées à un usage humain.

- 10 On a maintenant trouvé (1) de nouveaux vecteurs adénoviraux défectifs délétés de certaines régions spécifiques du génome adénoviral et plus adaptés au transfert d'une séquence nucléotidique exogène *in vivo* et (2) de nouvelles lignées de complémentation caractérisées, acceptables d'un point de vue pharmaceutique et donc offrant toutes les
15 caractéristiques de sécurité requises pour la production de produits destinés à un usage humain.

- L'intérêt de ces nouveaux vecteurs est qu'ils présentent une capacité de clonage accrue permettant l'insertion d'un ou plusieurs gènes d'intérêt de grande taille et une sécurité
20 d'emploi maximale. Ces mutations délétères rendent ces adénovirus incapables de réplication autonome et de transformation cellulaire et ceci sans altérer leur capacité à transférer et exprimer un gène d'intérêt.

- C'est pourquoi la présente invention a pour objet un vecteur adénoviral défectif pour la
25 réplication, capable d'être encapsidé dans une cellule de complémentation, qui dérive du génome d'un adénovirus comprenant de 5' en 3', un ITR 5', une région d'encapsidation, une région E1A, une région E1B, une région E2, une région E3, une région E4 et un ITR 3', par délétion :

- 30 (i) de tout ou partie de la région E1A, et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces ; ou
- (ii) de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins une région sélectionnée parmi les régions E2 et E4 ; ou

d'encapsidation

Au sens de la présente invention, l'expression "délétion" ou "dépourvu" se réfère à la suppression d'au moins un nucléotide dans la région ciblée et bien entendu il peut s'agir d'une délétion continue ou discontinue. Par tout ou partie, on entend soit l'intégralité soit une partie seulement de la région considérée. On préfère les délétions qui empêchent la production d'au moins un produit d'expression codé par ladite région. Elles peuvent donc se situer dans une région codante ou dans une région régulatrice comme la région promotrice et concerner au moins un nucléotide de manière à détruire le cadre de lecture d'un gène ou rendre une région promotrice non-fonctionnelle. Il peut également s'agir de délétions partielles d'un ou plusieurs gènes de ladite région ou de l'ensemble de la région.

Un vecteur adénoviral selon l'invention est déficient pour la réplication mais capable d'être répliqué et encapsidé dans une cellule de complémentation lui fournissant *en trans* le ou les produit(s) pour lesquels il est déficient afin de générer une particule adénovirale (encore désignée adénovirus déficient) incapable de réplication autonome dans une cellule hôte mais néanmoins infectieuse car ayant la capacité de délivrer le vecteur dans une cellule hôte.

Selon une première variante, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion de tout ou partie de la région E1A et de la partie de la région E1B comprenant l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces. Selon un mode préféré, elle concerne le promoteur et les séquences codant pour les produits d'expression de la région E1B c'est à dire les protéines précoces et n'inclut pas tout ou partie du signal de terminaison de la transcription qui recouvre les séquences codant pour la protéine tardive IX. S'agissant d'un vecteur adénoviral selon l'invention dérivant d'un adénovirus humain de type 5, ladite délétion comprend au moins les séquences comprises entre les nucléotides 1634 et 3509 du génome adénoviral dont la séquence est telle que divulguée dans la banque de donnée Genbank sous la référence M73260. Cette délétion a pour but de réduire ou supprimer les séquences communes entre un vecteur adénoviral selon l'invention et le fragment de génome adénoviral intégré dans une lignée de complémentation, par exemple la lignée 293. De plus, elle élimine d'un vecteur adénoviral selon l'invention des séquences dont les produits d'expression sont potentiellement oncogènes, du moins en conjonction avec les produits d'expression de la région E1A.

Par ailleurs, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive en outre du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion de tout ou partie :

- de la région E3 et/ou

- de la région E2 et/ou
- de la région E4.

5 Il va de soi qu'un vecteur adénoviral selon l'invention peut comporter une des trois délétions ci-dessus énoncées ou deux d'entre elles selon n'importe quelles combinaisons ou encore l'ensemble des délétions.

10 Selon un mode particulièrement avantageux, un vecteur adénoviral selon l'invention est délété d'une partie seulement de la région E3 et préférentiellement de la partie qui ne comprend pas les séquences codant pour la protéine gp19kDa. La présence de la
15 séquence codant pour la protéine gp19kDa dans un vecteur adénoviral selon l'invention, permettra aux cellules infectées d'échapper à l'immunosurveillance de l'hôte ; un critère important lorsque le protocole thérapeutique nécessite plusieurs administrations répétées. On choisira, de préférence, de placer les séquences codant pour la gp19kDa sous le
20 contrôle d'éléments appropriés permettant leur expression dans la cellule hôte, à savoir les éléments nécessaires à la transcription desdites séquences en ARNm et la traduction de ce dernier en protéine. Ces éléments comprennent en particulier un promoteur. De tels promoteurs sont bien connus de l'homme de l'art et sont insérés en amont de ladite
25 séquence codante par les techniques conventionnelles du génie génétique. Le promoteur retenu sera, de préférence, un promoteur constitutif non activable par un des produits d'expression de la région E1A. A titre d'exemples, on peut citer le promoteur du gène HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl coenzyme A réductase), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), le LTR (Long Terminal Repeat) du RSV (Rous Sarcoma Virus) ou le promoteur d'un gène PGK (phospho-glycerate kinase) d'eucaryote
supérieur.

30 Par ailleurs, un vecteur adénoviral selon l'invention, peut, de façon optionnelle, être délété de la partie de la région E3 correspondant à la région promotrice, laquelle sera substituée par une région promotrice hétérologue, telles l'une de celles mentionnées ci-dessus.

Selon une deuxième variante, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion continue ou discontinue de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins la région E2 et/ou E4. Une telle
délétion permet d'accroître les possibilités de clonage de gènes d'intérêt. D'autre part,
l'absence de la partie de la région E1A et de la région E2 et/ou E4 permet d'éliminer les
séquences codant pour des produits potentiellement oncogènes.

On préfère tout particulièrement un vecteur adénoviral selon l'invention dérivant du génome d'un adénovirus humain de type 5, par délétion :

- 5 (i) de l'intégralité de la partie codant pour les protéines précoces de la région E1B et s'étendant du nucléotide 1634 et se terminant au nucléotide 4047 ;
et/ou
- (ii) de la région E4 s'étendant des nucléotides 32800 à 35826 ; et/ou
- 10 (iii) de la partie de la région E3 s'étendant des nucléotides 27871 à 30748 ;
et/ou
- (iv) de la partie de la région d'encapsidation :
- 15 - allant du nucléotide 270 au nucléotide 346, ou
- allant du nucléotide 184 au nucléotide 273, ou
- 20 - allant du nucléotide 287 au nucléotide 358.

De préférence, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus sauvage ou naturel par délétion d'au moins 18 % dudit génome, d'au moins 22 %, d'au moins 25 %, d'au moins 30 %, d'au moins 40 %, d'au moins 50 %, d'au moins 60 %, d'au moins 70 %, d'au moins 80 %, d'au moins 90 % ou encore d'au moins 95 % et notamment de 98,5%.

Selon un mode particulièrement préféré, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus par délétion de l'ensemble du génome adénoviral à l'exclusion des ITRs 5' et 3' et de tout ou partie de la région d'encapsidation. Selon cette variante, il ne comprend que le minimum de séquences virales afin de limiter les risques de recombinaison, les risques d'oncogénécité et avoir une capacité de clonage maximale. On parlera alors d'un vecteur adénoviral "minimum" dans lequel il sera alors possible d'insérer jusqu'à 30kb de séquence nucléotidique exogène. Un vecteur adénoviral préféré dérive d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie du génome s'étendant des nucléotides

Dans le cadre de la présente invention, un vecteur adénoviral selon l'invention a pour objet le transfert et l'expression d'une séquence nucléotidique exogène dans une cellule hôte. Par "séquence nucléotidique exogène", on entend un acide nucléique qui comprend des séquences codantes et des séquences régulatrices permettant l'expression desdites
5 séquences codantes et dans lequel les séquences codantes sont des séquences qui ne sont normalement pas présentes dans le génome d'un adénovirus. Les séquences régulatrices peuvent être d'origine quelconque. La séquence nucléotidique exogène est introduite dans un vecteur adénoviral selon l'invention par les techniques classiques du génie génétique, entre la région d'encapsulation et l'ITR 3'.

10

Une séquence nucléotidique exogène peut être constituée d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt et, de manière préférée, d'intérêt thérapeutique. Dans le cadre de la présente invention, un gène d'intérêt peut coder soit pour un ARN anti-sens, soit pour un ARNm qui sera ensuite traduit en protéine d'intérêt. Un gène d'intérêt peut être de type
15 génomique, de type ADN complémentaire (ADNc) ou de type mixte (minigène, dans lequel au moins un intron est délété). Il peut coder pour une protéine mature, un précurseur d'une protéine mature, notamment un précurseur destiné à être sécrété et comprenant de ce fait un peptide signal, une protéine chimérique provenant de la fusion de séquence d'origine diverse ou un mutant d'une protéine naturelle présentant des
20 propriétés biologiques améliorées ou modifiées. Un tel mutant peut être obtenu par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotide(s) du gène codant pour la protéine naturelle.

Un gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle d'éléments appropriés à son expression
25 dans une cellule hôte. Par "éléments appropriés", on entend l'ensemble des éléments nécessaires à sa transcription en ARN (ARN anti-sens ou ARNm) et à la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi les éléments nécessaires à la transcription, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur régulable et il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou virale et même
30 adénovirale. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène d'intérêt en question. D'une façon générale, un promoteur en usage dans la présente invention, peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices. A titre d'exemples, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention, est placé sous le contrôle du promoteur des gènes d'immunoglobuline lorsque l'on cherche à cibler son transfert dans
35 des cellules hôtes lymphocytaires. On peut également citer le promoteur du gène TK-
HSV-1 (thymidine kinase du virus de l'herpès de type 1) ou encore le promoteur adénoviral MLP, notamment de l'adénovirus humain de type 2, permettant une expression dans un grand nombre de types cellulaires.

Parmi les gènes d'intérêt utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- 5 - les gènes codant pour des cytokines, comme l'interféron alpha, l'interféron gamma, les interleukines ;
- les gènes codant pour des récepteurs membranaires, comme les récepteurs reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites), de préférence par le virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain) ;
- 10 - les gènes codant pour des facteurs de coagulation, comme le facteur VIII et le facteur IX ;
- le gène codant pour la dystrophine ;
- 15 - le gène codant pour l'insuline ;
- les gènes codant pour des protéines participant directement ou indirectement aux canaux ioniques cellulaires, comme la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ;
- 20 - les gènes codant pour des ARN anti-sens ou des protéines capables d'inhiber l'activité d'une protéine produite par un gène pathogène, présent dans le génome d'un organisme pathogène, ou par un gène cellulaire, dont l'expression est dérégulée, par exemple un oncogène ;
- 25 - les gènes codant pour une protéine inhibant une activité enzymatique, comme l' α 1- antitrypsine ou un inhibiteur d'une protéase virale ;
- 30 - les gènes codant pour des variants de protéines pathogènes qui ont été mutées de façon à altérer leur fonction biologique, comme par exemple des variants trans-dominants de la protéine TAT du virus VIH capables de compétition avec la protéine naturelle pour la liaison à la séquence cible, empêchant ainsi l'activation du VIH ;

gène codant pour une protéine inhibant une activité enzymatique, comme l' α 1- antitrypsine ou un inhibiteur d'une protéase virale ;

immunité de la cellule note :

- les gènes codant pour les protéines de complexe majeur d'histocompatibilité des classes I et II, ainsi que les gènes codant pour les protéines inductrices de ces gènes ;
- 5 - les gènes codant pour des enzymes cellulaires ou produites par des organismes pathogènes ; et
- les gènes suicides. On peut citer plus particulièrement le gène suicide TK-
10 HSV-1. L'enzyme TK virale présente une affinité nettement supérieure par rapport à l'enzyme TK cellulaire pour certains analogues de nucléosides (comme l'acyclovir ou le gancyclovir). Elle les convertit en molécules monophosphatées, elles-mêmes convertibles, par les enzymes cellulaires, en précurseurs de nucléotides, qui sont toxiques. Ces
15 analogues de nucléotides sont incorporables dans les molécules d'ADN en voie de synthèse, donc principalement dans l'ADN des cellules en état de réplication. Cette incorporation permet de détruire spécifiquement les cellules en division comme les cellules cancéreuses.

20 Cette liste n'est pas limitative et d'autres gènes d'intérêt peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

Par ailleurs, selon un autre mode de mise en oeuvre de l'invention, un vecteur adénoviral selon l'invention peut en outre comprendre un gène non-thérapeutique codant pour une protéine trans-activatrice de la transcription non-adénovirale. Bien entendu, on évitera le
25 ou les gène(s) de la région E1A codant pour une protéine trans-activatrice, dont l'expression risquerait de rendre l'adénovirus non-défectif. On choisira, de préférence, le gène codant pour la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Son expression permettra la propagation du vecteur dans une lignée de complémentation telle que celle décrite ci-après. Une telle lignée est plus sophistiquée et permet de pallier à d'éventuels
30 problèmes de toxicité due à la production en continue des protéines adénovirales de complémentation. Le gène codant pour une protéine trans-activatrice de la transcription peut être placé, si nécessaire, sous le contrôle d'éléments appropriés à son expression ; par exemple ceux qui permettent l'expression d'un gène d'intérêt.

35 L'invention a également trait à une particule adénovirale ainsi qu'à une cellule eucaryote hôte comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention. Ladite cellule est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine et peut

complémentation selon l'invention est utile pour l'encapsulation de n'importe quel vecteur adénoviral défectif et, en particulier, d'un vecteur adénoviral défectif selon l'invention. Ainsi, lorsqu'on utilisera ci-après le terme "vecteur adénoviral défectif", il doit être entendu qu'il fait référence à un vecteur défectif quelconque, de l'art antérieur ou de la présente invention.

Par "élément de complémentation", on entend un acide nucléique comprenant au moins la partie du génome adénoviral en usage dans le cadre de la présente invention. Il peut être inséré sur un vecteur, par exemple de type plasmidique ou viral, par exemple rétroviral, adénoviral ou dérivé d'un poxvirus. On préférera néanmoins le cas où il est intégré dans le génome d'une lignée de complémentation selon l'invention. Les méthodes pour introduire un vecteur ou un acide nucléique dans une lignée cellulaire et éventuellement l'intégrer dans le génome d'une cellule constituent des techniques conventionnelles bien connues de l'homme de l'art, de même que les vecteurs utilisables à de telles fins. L'élément de complémentation peut être introduit dans une lignée de complémentation selon l'invention, de façon préalable ou concomitante à un vecteur adénoviral défectif.

Selon un mode de réalisation spécifique, une lignée de complémentation selon l'invention est destinée à compléter *en trans* un vecteur adénoviral défectif pour la fonction E1. Une telle lignée présente l'avantage de diminuer les risques de recombinaison puisque, contrairement à la lignée conventionnelle 293, elle est dépourvue de l'ITR 5' présent dans les vecteurs.

Dans le cadre de la présente invention, une lignée de complémentation selon l'invention peut comprendre tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus et :

- (i) tout ou partie d'au moins une région du génome adénoviral sélectionnée parmi les régions E1B, E2 et E4, ou
- (ii) tout ou partie d'au moins deux des régions E1B, E2 et E4 dudit génome, ou
- (iii) tout ou partie des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.

Dans le cadre de l'invention, lesdites régions peuvent être placées, si nécessaire, sous le contrôle d'éléments appropriés permettant leur expression. mais, on préfère les placer sous le contrôle de leur propre promoteur, inductible par la protéine trans-activatrice de transcription codée par la région E1A.

A titre indicatif, une lignée de complémentation selon la variante (ii) comprenant les régions E1A, E1B et E4 est destinée à la préparation d'un adénovirus déficient pour les fonctions E1 et E4 délété de tout ou partie des régions correspondantes.

5

Selon un mode avantageux, une lignée de complémentation selon l'invention, comprend notamment tout ou partie de la région E1A et l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1B.

- 10 Par ailleurs, selon une variante de ce mode de réalisation, une lignée de complémentation selon l'invention peut, en outre, être dépourvue de la région promotrice de la région E1A. Dans ce cas, la partie du génome adénoviral codant pour les protéines précoces de ladite région E1A sera placée sous le contrôle d'un promoteur hétérologue approprié et fonctionnel dans ladite lignée de complémentation. Il peut être isolé de n'importe quel
- 15 gène eucaryote ou viral. On évitera, cependant, d'avoir recours à un promoteur adénoviral d'une région précoce. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif. A titre d'exemples, on peut citer les promoteurs du virus SV40, du gène TK-HSV-1 et du gène murin PGK.
- 20 D'une manière alternative, le promoteur retenu peut être régulable et avantageusement, inducible par une protéine trans-activatrice de transcription non adénovirale. Il peut s'agir d'un promoteur isolé d'un gène naturellement inducible ou d'un promoteur quelconque modifié par l'addition de séquences d'activation (ou UAS, pour Upstream Activating Sequence en anglais) répondant à ladite protéine trans-activatrice. De manière
- 25 plus particulière, on préfère utiliser un promoteur inducible par la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* et, de préférence, un promoteur hybride constitué d'un promoteur dit "minimum" contenant uniquement les séquences d'initiation de la transcription (TATA box et site d'initiation) d'un gène quelconque (par exemple du gène TK-HSV-1 ou MLP d'Ad2), en amont duquel on a inséré au moins une séquence
- 30 d'activation du gène Gal10 de *Saccharomyces cerevisiae* (Webster et al., 1988, Cell, 52, 169-178). Cette dernière peut être synthétisée chimiquement ou isolée du gène Gal10, selon les techniques classiques du génie génétique. Ainsi, le promoteur hybride ne sera activé et n'induirait l'expression des gènes codés par la région E1A placés sous son contrôle, qu'en présence de la protéine Gal4. Puis, les produits d'expression de la région E1A, et à leur tour, induiraient l'expression des autres régions précoces E1B, E2 et/ou E4. Ce mode de réalisation particulier de l'invention, évite la production d'une lignée constitutive (éventuellement toxique) des protéines adénovirales nécessaires à la

complémentation. Ainsi, l'induction peut être déclenchée en présence d'un vecteur adénoviral défectif selon l'invention exprimant la protéine Gal4. Cependant une telle lignée peut également être utilisée pour préparer n'importe quel vecteur adénoviral défectif, à la condition toutefois de fournir *en trans* la protéine Gal4. Les moyens de
5 fournir *en trans* une protéine sont connus de l'homme du métier.

D'une manière générale, une lignée de complémentation comprend une partie du génome d'un adénovirus qui dérive avantageusement d'un adénovirus animal, comme un adénovirus canin ou aviaire ou, de préférence, d'un adénovirus humain et, tout
10 particulièrement, du type 2 ou 5.

Une lignée de complémentation selon l'invention comprend notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant :

- 15 (i) du nucléotide 100 au nucléotide 5297 de la séquence telle que divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260, ou
- (ii) du nucléotide 100 au nucléotide 4034, ou
- 20 (iii) du nucléotide 505 au nucléotide 4034.

Avantageusement, la partie du génome selon (ii) est insérée en amont d'un signal de terminaison de la transcription, comme par exemple le signal de polyadénylation du virus SV40 (Simian Virus 40) ou du gène β -globine de lapin. Alors que la partie selon (iii) qui
25 ne comprend ni les séquences promotrices de la région E1A, ni le signal de terminaison de la transcription de la région E1B est placée sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment d'un promoteur inductible par la protéine Gal4, et d'un signal de terminaison de la transcription, par exemple celui du gène β -globine de lapin. Une telle lignée de complémentation est considérée comme particulièrement sûre car dépourvue de
30 la majorité des séquences communes avec un adénovirus défectif.

D'autre part, une lignée de complémentation selon l'invention peut comporter la partie de la région E4 d'un adénovirus humain de type 5 allant du nucléotide 32800 et se terminant au nucléotide 35826 de la séquence telle que divulguée dans la banque de donnée
35 Genebank sous la référence M73260.

Par ailleurs, une lignée de complémentation selon l'invention peut comporter l'ensemble du génome d'un adénovirus naturel, à l'exception de la région d'encapsidation et des ITRs

On mesure le niveau d'expression de la protéine CFTR dans les extraits cellulaires de cellules 293 infectées par AdTG6546. L'analyse est effectuée par Western blot selon la technique décrite dans Dalemans et al. (1991, Nature, *supra*) en mettant en oeuvre
5 l'anticorps monoclonal MATG1031. Mais, tout autre anticorps reconnaissant des épitopes antigéniques de la protéine CFTR peut être utilisé. On révèle un produit d'une masse moléculaire attendue d'environ 170 kDa. A titre indicatif, le niveau de production est à peu près équivalent à celui obtenu dans les extraits cellulaires infectés par le virus non atténué Ad-CFTR.

10

EXEMPLE 2 : Génération d'un adénovirus déficient délété de la région E1A et de l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1B.

15

1. Obtention d'un adénovirus recombinant pour l'expression de la protéine CFTR (AdTG6581)

Un tel adénovirus est généré à partir d'un vecteur plasmidique pTG6581 comprenant de 5' vers 3' :

20

- l'ITR 5' de l'Ad5 (des nucléotides 1 à 103),

- la région d'encapsulation de l'Ad5 (des nucléotides 104 à 458),

25

- une séquence nucléotidique exogène comportant une cassette d'expression, laquelle comprend les éléments suivants :

30

* le MLP de l'Ad2 (nucléotides 5779 à 6038), suivi des trois leaders tripartites également de l'Ad2 (nucléotides 6039-6079 ; nucléotides 7101-7175 ; nucléotides 9637-9712) ; ces leaders sont inclus afin d'augmenter l'efficacité de traduction des séquences insérées en aval,

35

* un polylinker comprenant de 5' vers 3' les sites de restrictions *XbaI*, *HindIII*, *BamHI* *EcoRV*, *HpaI* et *NotI* utilisables pour le clonage d'un gène d'intérêt,

* un gène d'intérêt, comme le gène codant pour la protéine CFTR,

* le signal de terminaison de la transcription isolé du virus SV40 (nucléotides 2543 à 2618),

- la portion du génome adénoviral de l'Ad5 allant des nucléotides 4047 à 6241.

5 Le fragment du génome de l'Ad5 s'étendant du nucléotide 4047 au nucléotide 4614 est amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique d'Ad5. La réaction PCR met en oeuvre l'amorce sens OTG5021 (SEQ ID NO: 4), comprenant en son extrémité 5' un site *Bam*HI destiné à faciliter les étapes de clonage ultérieures, et l'amorce anti-sens OTG5157 (SEQ ID NO: 5.) Le fragment ainsi généré est traité à l'ADN polymérase Klenow, avant d'être cloné dans le site *Sma*I de M13mp18 (Gibco BRL), donnant lieu au M13TG6517. La
10 séquence du fragment généré par PCR est vérifiée selon la méthode enzymatique classique (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463).

Par ailleurs, le fragment *Pvu*I-*Sma*I est isolé de pMLP11. Il est cloné entre les sites *Pvu*I et *Kpn*I de pTG6511 (exemple 1.1), le site *Kpn*I ayant été rendu franc par un traitement
15 à l'ADN polymérase du phage T4 selon les méthodes standards. On génère ainsi le vecteur pTG6547.

Ce dernier est digéré par les enzymes *Sal*I et *Bst*XI et ligué à deux fragments, d'une part le fragment *Bam*HI-*Bst*XI purifié de M13TG6517 et, d'autre part, le fragment *Xho*I-*Bgl*II de pTG6185. Ce dernier comprend notamment le signal de terminaison de la
20 transcription du virus SV40 encadré par les sites de restriction *Xho*I et *Bgl*II. Mais, tout autre plasmide comportant la même séquence de terminaison et des sites de restriction adéquates pourrait être utilisé. On obtient le vecteur pTG6555, dans lequel on insère dans le site unique *Bam*HI un adaptateur contenant deux sites de restriction générant des
25 extrémités franches, *Eco*RV et *Hpa*I. Cet adaptateur provient de la réassociation des oligonucléotides OTG5564 et OTG5565 (SEQ ID NO: 6 et 7). On obtient pTG6580. Enfin, le fragment *Sac*I-*Pst*I de pTG6525 dont les extrémités ont été rendues franches et comportant l'ADNc CFTR humain, est cloné dans le site *Eco*RV de pTG6580. On génère pTG6581 (Figure 3).

30 L'adénovirus recombinant correspondant AdTG6581 est généré par co-transfection de pTG6581 et Ad dl324 clivés par *Cla*I dans une lignée de complémentation pour la fonction E1, comme la lignée 293 ou une lignée de l'exemple 6, selon le protocole classique.

suivi de la partie 5' de la région E3 et on l'insère entre les sites *Bam*HI (position 27331 ou 30049) et *Bst*W (position 28390) des vecteurs obtenus à l'étape précédente pour générer pTG1977 et pTG1978. Puis le fragment *Eco*RI obtenu de chacun de ces deux vecteurs est intégré dans pTG1679, en remplacement du fragment *Eco*RI sauvage. On obtient pTG1679-E3+. A titre indicatif, le vecteur pTG1679 résulte du clonage du fragment *Bst*EII-*Kpn*I (site rendu franc par traitement à la T4 polymérase) de pTG6590 (exemple 3.1) entre les sites *Bst*EII-*Bam*HI (site rendu franc par traitement à la Klenow polymérase) de pTG6584 (exemple 3.1).

On génère une particule d'adénovirus par recombinaison homologue dans une lignée de complémentation pour la fonction E1, entre le fragment *Aat*II de pTG1679-E3+ et un vecteur adénoviral tel que l'Ad dl324 ou Ad-RSV β -gal. Ce dernier contient le gène de la β -galactosidase à la place de la région E1 (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest., 90, 626-630).

EXEMPLE 3 : Construction d'un vecteur adénoviral recombinant à capacité de clonage améliorée par délétion partielle des régions E1 et E3

1. Construction de pTG6590 Δ E3

Le fragment portant la partie du génome de l'Ad5 comprise entre les nucléotides 27325 et 27871, est amplifié par PCR à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et à l'aide des amorces OTG6064 et OTG6065 (SEQ ID NO: 14 et 15). OTG6065 comprend à son extrémité 5' un site *Bsm*I, également présent dans la région E3 (en position 30750).

Le fragment amplifié est cloné dans le site *Sma*I de M13mp18, pour donner M13TG6523. Le fragment *Eco*RI-*Bsm*I est isolé de ce dernier pour être introduit dans le vecteur pTG6590 clivé par les mêmes enzymes. On obtient pTG6590 Δ 3, lequel contient la partie 3' du génome adénoviral (des nucléotides 27082 à 35935) déletée de la région E3 comprise entre les nucléotides 27872 à 30740, alors que pTG6590 est déleté d'une partie plus petite de la région E3 (position 28592 à 30470). Le vecteur pTG6590 est obtenu de la façon suivante : on génère par PCR un fragment s'étendant des nucléotides 35228 à 35935 (comportant l'ITR 3') à partir d'une préparation génomique d'Ad5 et à l'aide des amorces OTG5481 et OTG5482 (SEQ ID NO: 16 et 17). Celui-ci est, ensuite, cloné dans le site *Sma*I de M13mp18 pour donner M13TG6519. D'autre part, le vecteur

On obtient pTG6590 Δ 3.

Un vecteur adénoviral dit "minimum" est constitué par clonage dans un plasmide des éléments suivants :

- l'ITR 5' de l'Ad5 (des nucléotides 1 à 103) ;
- la région d'encapsidation de l'Ad5 (des nucléotides 104 à 458) ;
- une séquence nucléotidique exogène comprenant :
 - * un premier gène d'intérêt thérapeutique placé de préférence sous le contrôle de son propre promoteur afin d'obtenir une régulation de l'expression la plus proche possible de la régulation naturelle,
 - * un deuxième gène d'intérêt constitué du gène TK-HSV-1, et
 - * de manière facultative, des séquences nucléotidiques quelconques ajoutées pour des raisons d'efficacité de replication ou d'encapsidation de manière à ce que la taille totale du génome à encapsider soit comprise entre 30 et 36kb ;
 - * les séquences codant pour la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* (Laughon et Gesteland, 1984, Mol. Cell. Biol., 4, 260-267) placées sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans une cellule eucaryote supérieure ; et
- l'ITR 3' de l'Ad5 (des nucléotides 35833 à 35935).

L'assemblage de ces différents éléments est réalisé selon les techniques standards de biologie moléculaire. L'obtention de virions infectieux comprenant un tel vecteur se fait comme décrit précédemment dans une lignée de complémentation de l'exemple 7.

EXEMPLE 6 : Constitution d'une cellule de complémentation capable de compléter en trans la fonction E1.

1. Constitution d'une cellule de complémentation comprenant la région E1 des nucléotides 100 à 5297 (pTG6533)

Celle-ci comporte :

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
ACCGAGTAAG ATTTGTCTAG GGCCGCGGGG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 33 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4191)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:
GGCCATGGTC GCGGGAAAGG GACTTTGACC GTT

33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5021)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:
GAACGGATCC CCAGACTCTG TTTGGATTG G

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(iii) ANTI-SENS: OUI

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6064)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GAAACCGAAT TCTCTTGGA C

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6065)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

ACGAATGCAG CTCTCCACTT AACATTCACT CG

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5481)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

CAGTGAATTC ATCATCAATA ATATACC

27

- (A) LONGUEUR: 14 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6060)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

AATAAAAGAT CATTATTTTC ATTAGAACTG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6061)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

TGTGTTGGTT TTTTGTGTGT TAAT

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6062)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

TAACACACAA AAAACCAACA CACAGTTCTA

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6063)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

ATGAAAATAA TGATCTTTTA TTAT

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 27:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4564)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

TCCGTGAATT CTAGTAGTGT GCGGGAAGTG TG

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 28:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

Revendications

1. Un vecteur adénoviral défectif pour la réplication, capable d'être encapsidé dans une cellule de complémentation, qui dérive du génome d'un adénovirus comprenant de 5' en 3', un ITR 5', une région d'encapsidation, une région E1A, une région E1B, une région E2, une région E3, une région E4 et un ITR 3', par délétion :
 - (i) de tout ou partie de la région E1A, et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces ; ou
 - (ii) de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins une région sélectionnée parmi les régions E2 et E4 ; ou
 - (iii) de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.
 2. Un vecteur adénoviral selon la revendication 1, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces.
 3. Un vecteur adénoviral selon la revendication 2, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E3.
 4. Un vecteur adénoviral selon la revendication 2 ou 3, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E2.
 5. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 2 à 4, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E4.
 6. Un vecteur adénoviral selon la revendication 1, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie de la région E2.
- adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E4.

8. Un vecteur adénoviral selon la revendication 6 ou 7, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1B.
9. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 6 à 8, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E3.
10. Un vecteur adénoviral selon la revendication 6, 8 ou 9, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E4.
11. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 3 à 5, 9 ou 10, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion partielle de la région E3 dudit génome en maintenant la partie de ladite région E3 codant pour la protéine gp19kDa.
12. Un vecteur adénoviral selon la revendication 11, dans lequel la partie de la région E3 codant pour la protéine gp19kDa est placée sous le contrôle des éléments appropriés à l'expression de ladite protéine dans la cellule hôte.
13. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 12, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.
14. Un vecteur adénoviral selon la revendication 13, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région d'encapsidation :
 - (i) s'étendant du nucléotide 270 au nucléotide 346 ;
 - (ii) s'étendant du nucléotide 184 au nucléotide 273 ; ou
 - (iii) s'étendant du nucléotide 287 au nucléotide 358.
15. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14, qui dérive du génome d'un adénovirus sélectionné parmi les adénovirus canins aviaires et humains.
16. Un vecteur adénoviral selon la revendication 15, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5.

17. Un vecteur adénoviral selon la revendication 16, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région E1B s'étendant du nucléotide 1634 jusqu'au nucléotide 4047 au moins.
18. Un vecteur adénoviral selon la revendication 16 ou 17, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 notamment par délétion de la partie de la région E3 s'étendant du nucléotide 27871 jusqu'au nucléotide 30748.
19. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 16 à 18, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région E4 s'étendant du nucléotide 32800 au nucléotide 35826.
20. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 19, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 18 % du génome dudit virus.
21. Un vecteur adénoviral selon la revendication 20, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 22 % du génome dudit virus.
22. Un vecteur adénoviral selon la revendication 21, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 40 % du génome dudit virus.
23. Un vecteur adénoviral selon la revendication 22, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 95 % du génome dudit virus.
24. Un vecteur adénoviral selon la revendication 23, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de l'ensemble du génome dudit adénovirus à l'exclusion des ITRs 5' et 3' et de tout ou partie de la région d'encapsidation.
25. Un vecteur adénoviral selon la revendication 24, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie du génome viral s'étendant des nucléotides 459 à 35832.
26. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 25, qui comprend en outre une séquence nucléotidique exogène.

Un tel vecteur adénoviral peut être généré de façon à ce que son expression d'intérêt place sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.

28. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 26 ou 27, qui comprend en outre un gène codant pour une protéine trans-activatrice de transcription non adénovirale ; ledit gène étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires à l'expression de ladite protéine dans une cellule hôte.
29. Un vecteur adénoviral selon la revendication 28, comprenant le gène codant pour la protéine trans-activatrice de transcription Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.
30. Une particule d'adénovirus comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29.
31. Une cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29 ou une particule d'adénovirus selon la revendication 30.
32. Une lignée de complémentation comportant un élément de complémentation, comprenant notamment une partie de la région E1 du génome d'un adénovirus à l'exclusion de l'ITR 5' ; ledit élément de complémentation étant capable de compléter *en trans* un vecteur adénoviral défectif et étant intégré dans le génome de ladite lignée de complémentation ou inséré dans un vecteur d'expression.
33. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et
 - (ii) tout ou partie d'au moins une région dudit génome sélectionnée parmi les régions E1B, E2 et E4.
34. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et
 - (ii) tout ou partie d'au moins deux des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.
35. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et

- (ii) tout ou partie des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.
- 36. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 33 à 35, comprenant notamment tout ou partie de la région E1A et l'intégralité de la région E1B du génome d'un adénovirus codant pour les protéines précoces.
 - 37. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 36, comprenant notamment une partie du génome d'un adénovirus sélectionné parmi les adénovirus canins, aviaires et humains.
 - 38. Une lignée de complémentation selon la revendication 37, comprenant notamment une partie du génome d'un adénovirus humain de type 5.
 - 39. Une lignée de complémentation selon la revendication 38, comprenant notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 :
 - (i) s'étendant du nucléotide 100 au nucléotide 5297 ;
 - (ii) s'étendant du nucléotide 100 au nucléotide 4034 ; ou
 - (iii) s'étendant du nucléotide 505 au nucléotide 4034.
 - 40. Une lignée de complémentation selon la revendication 38 ou 39, comprenant notamment la partie de la région E4 du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant du nucléotide 32800 au nucléotide 35826.
 - 41. Une lignée de complémentation selon la revendication 38, comprenant notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant du nucléotide 505 au nucléotide 35826.
 - 42. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 41, comprenant une partie de la région E1A du génome d'un adénovirus dépourvue de son promoteur naturel ; ladite partie étant placée sous le contrôle d'un promoteur approprié.

43. Une lignée de complémentation selon la revendication 42, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription non-adénovirale.
44. Une lignée de complémentation selon la revendication 43, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription codée par un vecteur adénoviral selon la revendication 28 ou 29.
45. Une lignée de complémentation selon la revendication 43 ou 44, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par la protéine trans-activatrice de transcription Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.
46. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 45, comprenant en outre un gène codant pour un marqueur de sélection.
47. Une lignée de complémentation selon la revendication 46, dans laquelle le gène de sélection code pour la puromycine acetyl-transférase.
48. Une lignée de complémentation selon la revendication 46 ou 47, dans laquelle le gène de sélection est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription codée par la région E1A du génome d'un adénovirus sauvage, notamment sous le contrôle du promoteur de la région E2 dudit génome.
49. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 48, dérivée d'une lignée cellulaire acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
50. Une lignée de complémentation selon la revendication 49, dérivée d'une lignée cellulaire sélectionnée parmi les lignées Vero, BHK, A549, MRC5, W138 et CHO.
51. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 48, dérivée d'une cellule de la rétine d'un embryon humain.
52. Un procédé de préparation d'une particule d'adénovirus selon la revendication 30, selon lequel :

- (i) on introduit un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29 dans une lignée de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur adénoviral pour obtenir une lignée de complémentation transfectée ;
 - (ii) on cultive ladite lignée de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule d'adénovirus ; et
 - (iii) on récupère ladite particule d'adénovirus dans la culture cellulaire.
53. Un procédé selon la revendication 52, selon lequel on met en oeuvre une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51.
54. Usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29, d'une particule d'adénovirus selon la revendication 30 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé selon la revendication 52 ou 53, d'une cellule hôte eucaryote selon la revendication 31 ou d'une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51.
55. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29, une particule d'adénovirus selon la revendication 30 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé selon la revendication 52 ou 53, une cellule eucaryote selon la revendication 31 ou une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

2/11

pTG6546

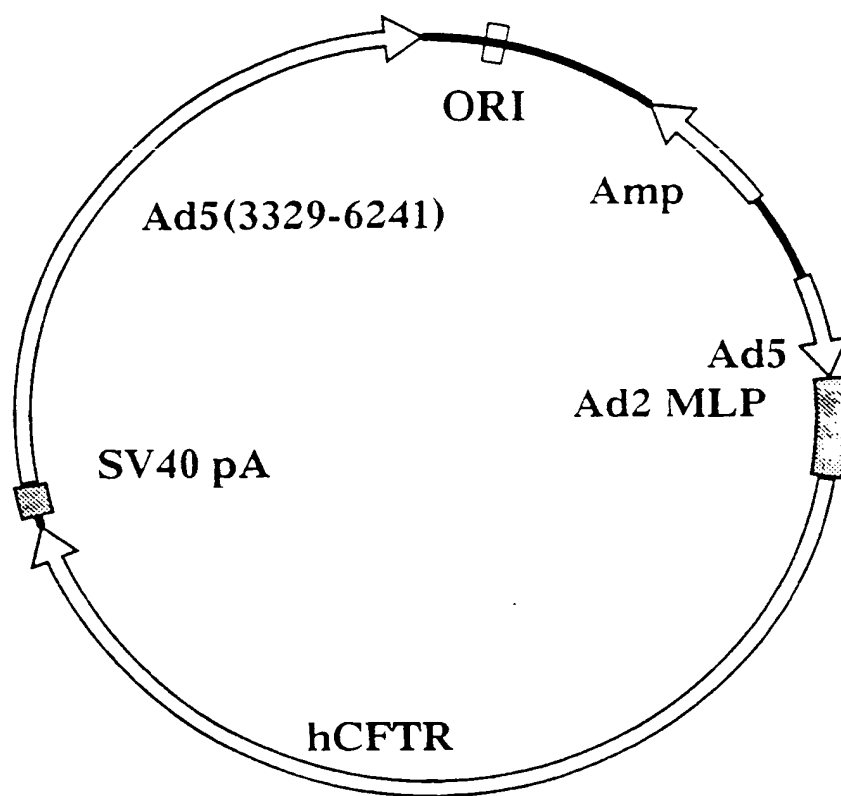


FIGURE 2

3 / 11

pTG6581

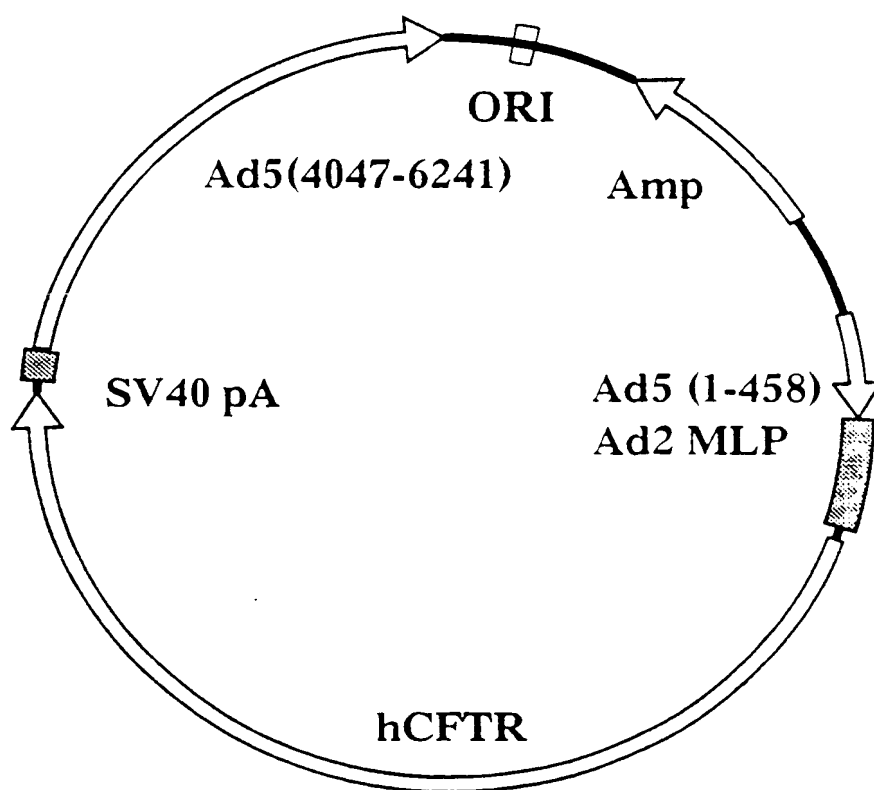


FIGURE 3

4 / 11

pTG6303

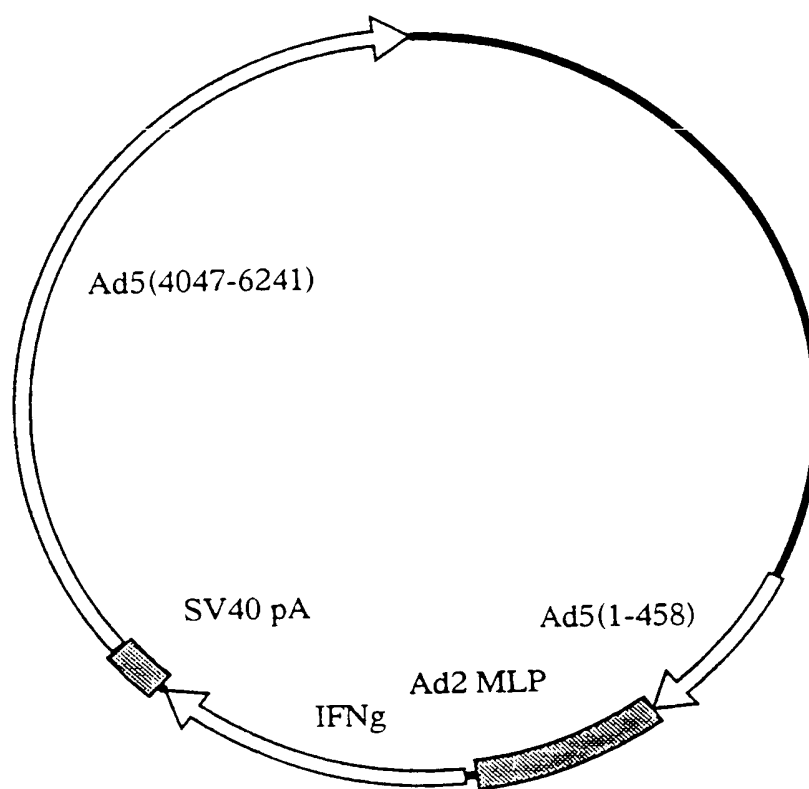


FIGURE 4

5/11

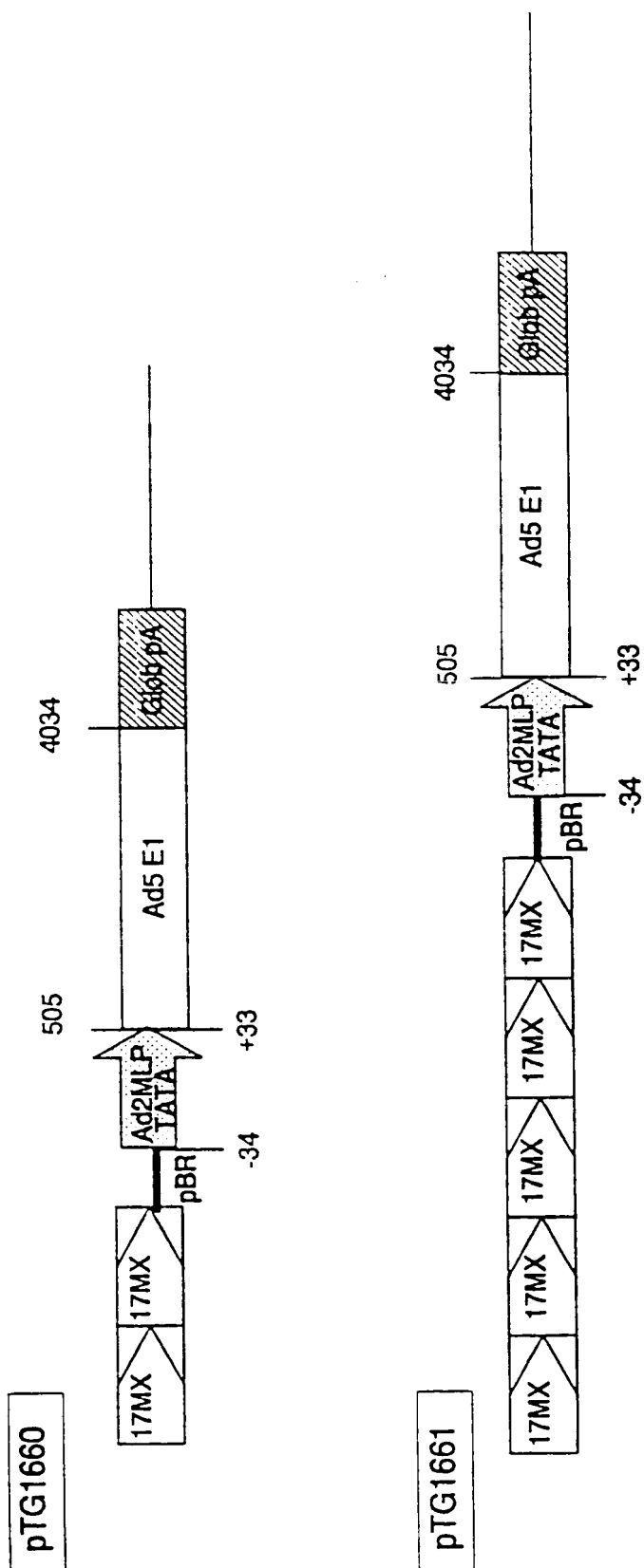


FIGURE 5

6/11

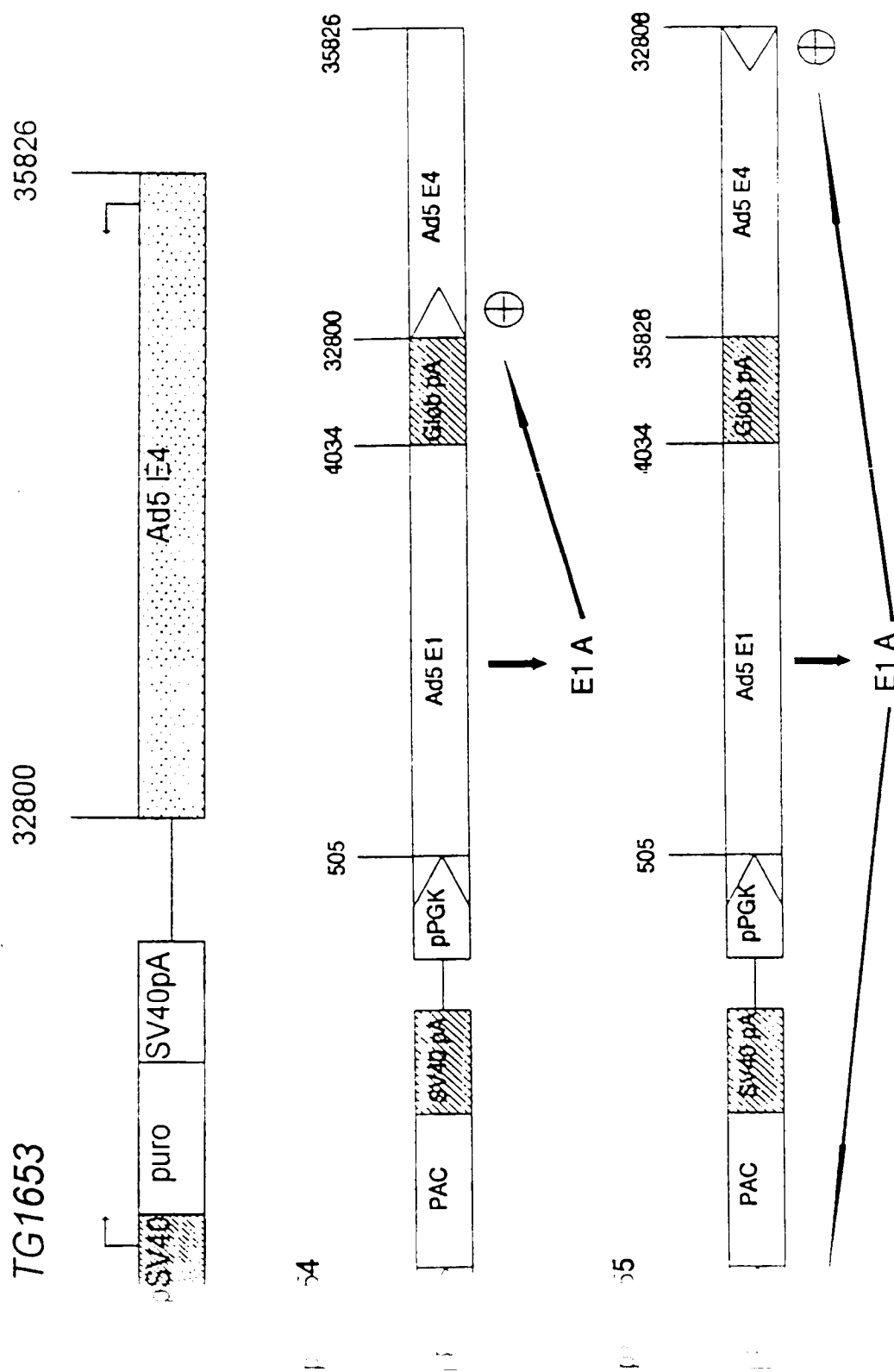


FIGURE 6

7/11

pTG5913

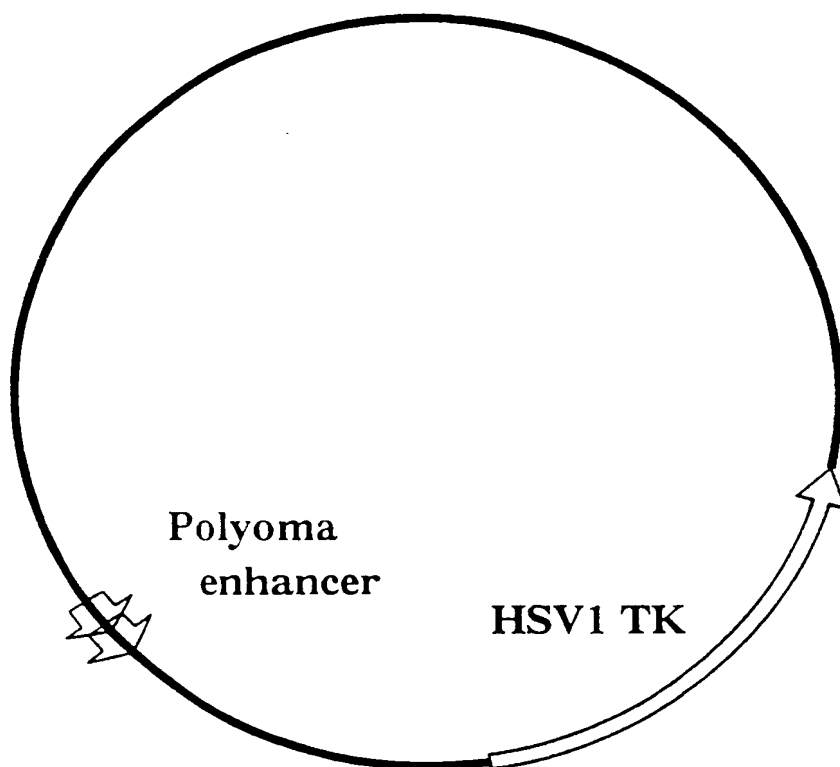


FIGURE 7

8 / 11

pTG8512

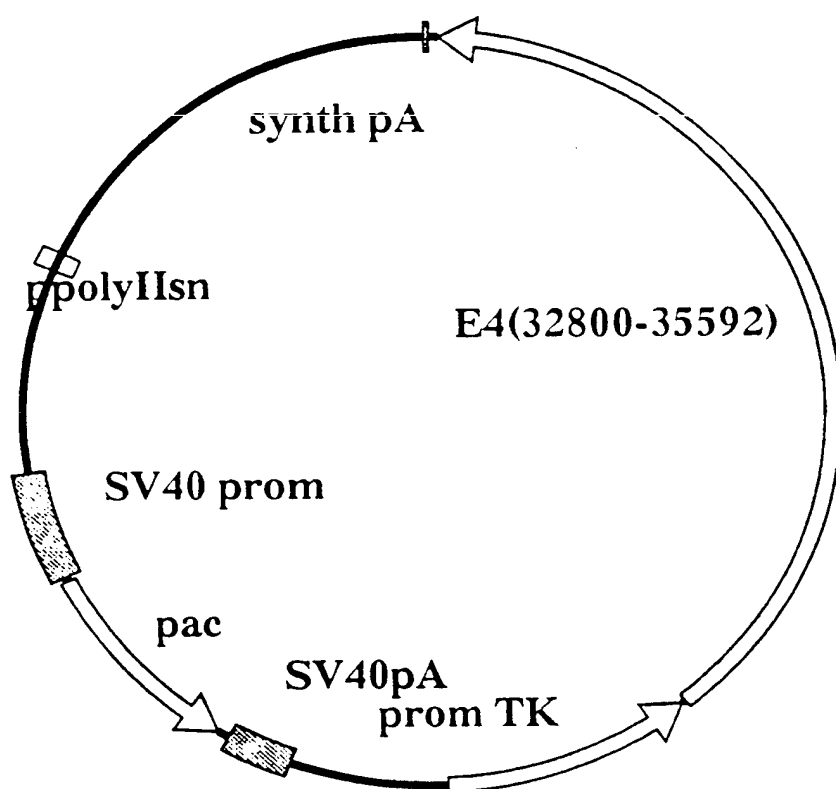


FIGURE 8

9/11

pTG8513

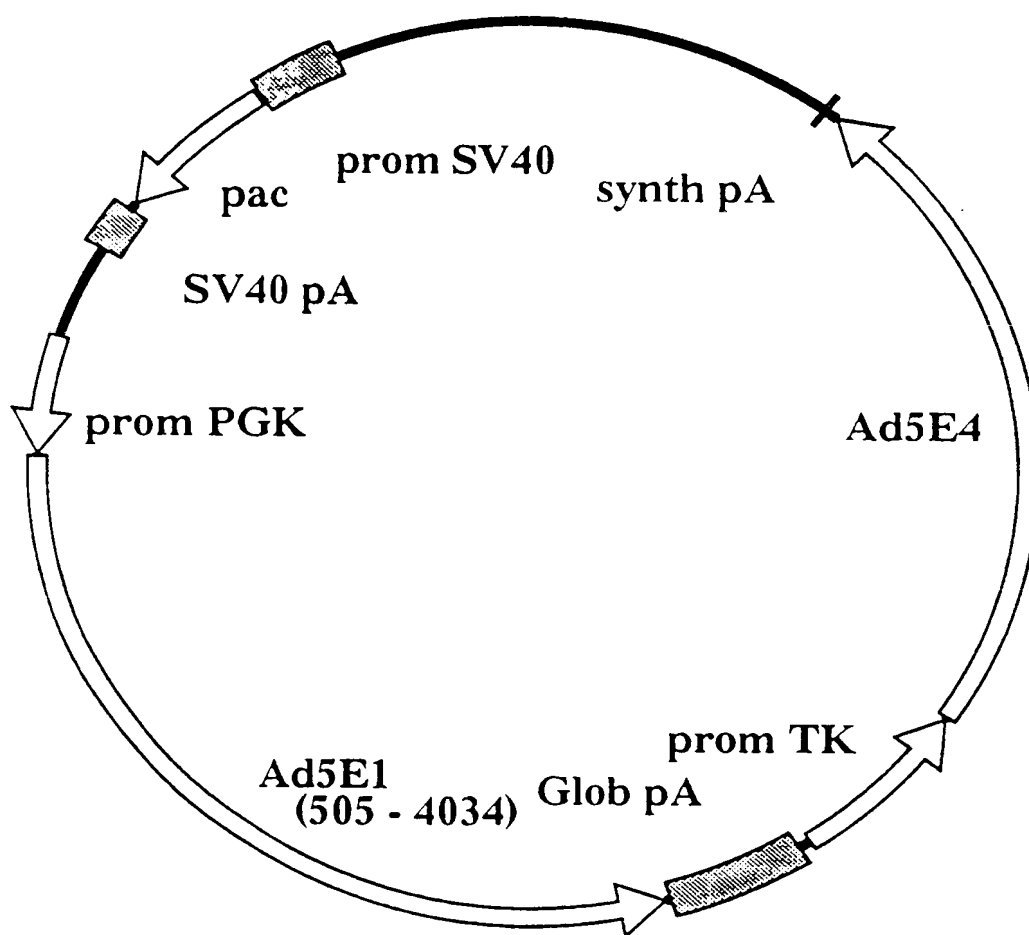


FIGURE 9

10/11

pTG8514

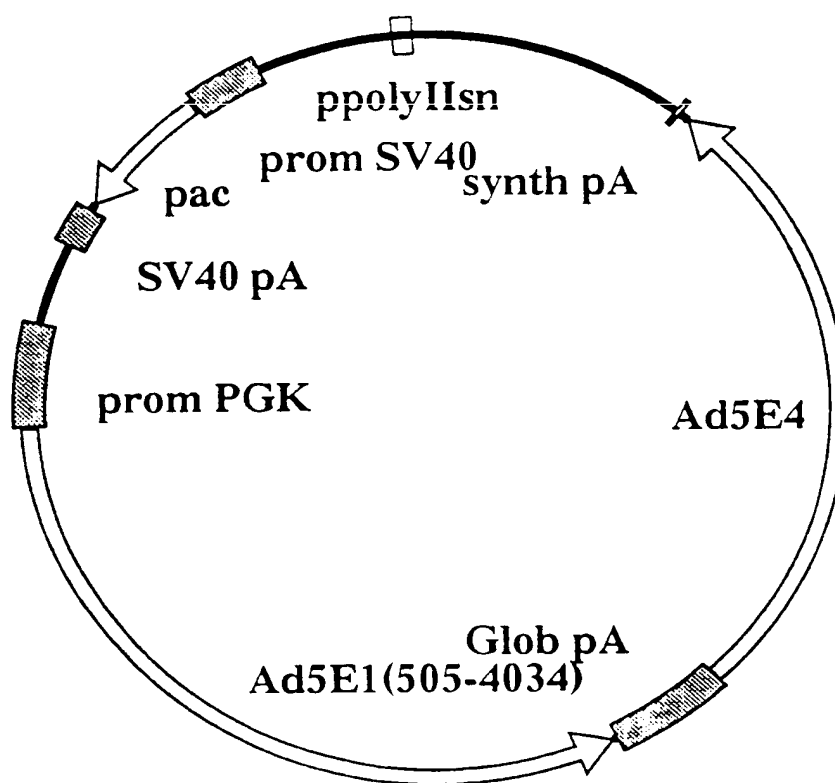


FIGURE 10

11/11

pTG8515

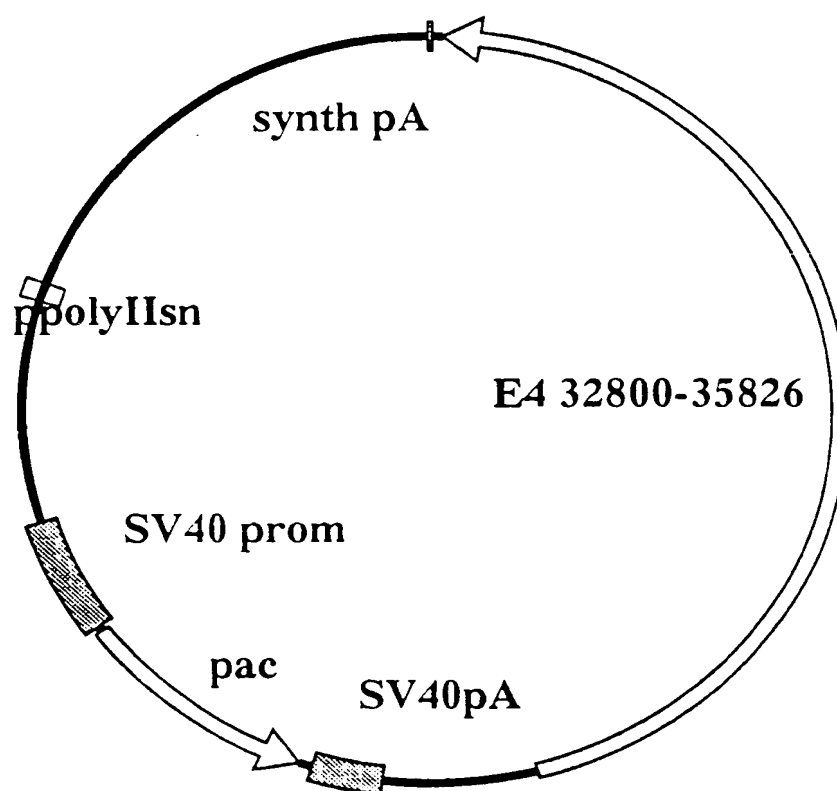


FIGURE 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 94/00624

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CELL. vol. 68, no. 1 , 10 January 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 143 - 155 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance gene to the airway epithelium' see the whole document ----	9-11
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 April 1993 see claim 3 ----	1
E	WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 June 1994 see the whole document -----	1-10,15, 24,26, 27, 30-32, 42,43, 46,49, 50,52-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786	02-04-93
		AU-A- 2790292	27-04-93
		EP-A- 0559884	15-09-93
		JP-T- 6502771	31-03-94

WO-A-9412649	09-06-94	NONE	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' voir page 58, alinéa 6 ---	1
A	CELL. vol. 68, no. 1 , 10 Janvier 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 143 - 155 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance gene to the airway epithelium' voir le document en entier ---	9-11
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 Avril 1993 voir revendication 3 ---	1
E	WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 Juin 1994 voir le document en entier -----	1-10,15, 24,26, 27, 30-32, 42,43, 46,49, 50,52-55

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den . Internationale No

PCT/FR 94/00624

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786	02-04-93
		AU-A- 2790292	27-04-93
		EP-A- 0559884	15-09-93
		JP-T- 6502771	31-03-94

WO-A-9412649	09-06-94	AUCUN	
